

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年12 月5 日 (05.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/097064 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 1/21, 15/09, 9/42
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/05151
(22) 国際出願日: 2002 年5 月28 日 (28.05.2002)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願2001-160520 2001 年5 月29 日 (29.05.2001) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 花王株式会社 (KAO CORPORATION) [JP/JP]; 〒103-8210 東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目14 番10 号 Tokyo (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 澤田 和久 (SAWADA, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP). 遠藤 圭二 (ENDO, Keiji) [JP/JP]; 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP). 小澤 忠弘 (OZAWA, Tadahiro) [JP/JP]; 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP). 東畑 正敏 (TOHATA, Masatoshi) [JP/JP]; 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP). 尾崎 克也 (OZAKI, Katsuya) [JP/JP]; 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP).
(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目3 番6 号共同ビル Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): CN, US.
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: HOST MICROORGANISMS

(54) 発明の名称: 宿主微生物

(57) Abstract: A microorganism wherein one or more genes selected from among a group of genes participating in sporulation in the medium to latter stages of sporulation have been deleted or inactivated; and a process for producing a target product (a protein) using the microorganism. No spore is formed by using this microorganism, which makes it possible to produce a target product (a protein) while relieving energy loss, suppressing the production of a by-product and a decrease in the specific production speed, and largely saving unnecessary consumption of a medium. Moreover, the production period can be prolonged thereby and thus the target product (the protein) can be efficiently produced.

(57) 要約:

本発明は、孢子形成中期から後期において孢子の形成に関与する遺伝子群から選ばれた 1 以上の遺伝子を削除又は不活性化した微生物及び当該微生物を用いた目的生産物 (タンパク質) の製造方法に関する。

この微生物を用いれば、孢子が形成されないことから、目的生産物 (タンパク質) を生産する場合において、エネルギーロス、副産物の生産や比生産速度の低下等、培地の浪費が大幅に減少でき、また、生産期間の長期化などによって効率よく目的生産物 (タンパク質) を生産することができる。



WO 02/097064 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

宿主微生物

技術分野

本発明は、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産に用いる宿主微生物、及び組換え微生物に関する。

背景技術

微生物による有用物質の工業的生産は、アルコール飲料や味噌、醤油等の食品類をはじめとし、アミノ酸、有機酸、核酸関連物質、抗生物質、糖質、脂質、タンパク質等、その種類は多岐に渡っており、またその用途についても食品、医薬や、洗剤、化粧品等の日用品、或いは各種化成品原料に至るまで幅広い分野に広がっている。

こうした微生物による有用物質の工業生産においては、その生産性の向上が重要な課題の一つであり、その手法として、突然変異等の遺伝学的手法による生産菌の育種が行われてきた。特に最近では、微生物遺伝学、バイオテクノロジーの発展により、遺伝子組換え技術等を用いたより効率的な生産菌の育種が行われるようになっており、遺伝子組換えのための宿主微生物の開発が進められている。例えば、枯草菌Marburg No. 168系統株の様に宿主微生物として安全かつ優良と認められた微生物菌株に更に改良を加えた菌株が開発されている。

しかしながら、微生物は元来、自然界における環境変化に対応するための多種多様な遺伝子群を有しており、限定された生産培地が使用されるタンパク質等の工業的生産においては、必ずしも生産性が効率的であるとは言えない状況であった。

また、ある種の微生物については、孢子形成初期に関わる遺伝子を単独に削除又は不活性化した菌株が構築されているが、生産性向上の効果が十分とはいえも

のではない。

従って、本発明はタンパク質又はポリペプチドの生産に不要或いは有害な遺伝子をゲノム上から削除又は不活性化することにより、タンパク質又はポリペプチドの生産性向上を可能とする宿主微生物を提供することを目的とする。また、本発明は当該宿主微生物に転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌用シグナル領域の下流に結合したタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して得られる組換え微生物、更に、当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、微生物ゲノム上にコードされる各種遺伝子において、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要或いは有害な働きをする遺伝子群を鋭意探索したところ、孢子形成に関与する特定の遺伝子をゲノム上から削除又は不活性化した後、目的のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を適当な転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域を結合して導入することにより、目的のタンパク質又はポリペプチドの生産性が、削除又は不活性化前と比較して向上することを見出した。

すなわち本発明は、孢子形成中期から後期において孢子の形成に関与する遺伝子群から選ばれた 1 以上の遺伝子を削除又は不活性化した微生物、当該微生物に転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌用シグナル領域の下流に結合したタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して得られる組換え微生物、並びに当該組換え微生物を用いたタンパク質又はポリペプチドの製造方法を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の微生物を構築するための親微生物としては、孢子形成に関与する遺伝

子を有するものであればよく、胞子を形成する微生物がより好ましい。これらは、野生型のものでも変異を施したもののよい。具体的には、枯草菌などのバチルス (*Bacillus*) 属細菌や、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌、或いは酵母等が挙げられ、中でもバチルス (*Bacillus*) 属細菌が好ましい。更に、全ゲノム情報が明らかにされ、遺伝子工学、ゲノム工学技術が確立されている点、またタンパク質と菌体外に分泌生産させる能力を有する点から特に枯草菌が好ましい。

本発明の微生物を用いて生産する目的タンパク質又はポリペプチドとしては、例えば食品用、医薬品用、化粧品用、洗浄剤用、繊維処理用、医療検査薬用等として有用な酵素や生理活性因子等のタンパク質やポリペプチドが挙げられる。

胞子の形成にはゲノム上に散在する 2 5 0 遺伝子以上が関与することが知られているが、本発明において削除又は不活性の対象となる遺伝子群は、胞子形成期特異的 σ 因子をコードする遺伝子群や当該 σ 因子遺伝子群の発現、及び σ 因子の活性化に関わる遺伝子群等、胞子の形成を促進する遺伝子群が好ましい。また、当該 σ 因子によって転写され、胞子形成の促進に関与する遺伝子群も包含されるが、胞子形成期の初期（胞子形成第 0 期～第 I 期）は、対数増殖期に比較してプロテアーゼやアミラーゼなどの各種菌体外酵素の生産が高まることが知られているため、削除又は不活性化する遺伝子としては、胞子形成期中期から後期にかけて特異的に発現し、胞子形成に関与するものが望ましい。具体的には、胞子形成第 II 期、第 III 期、第 IV 期、或いは第 V 期に関与する遺伝子群が好ましく、特に、胞子形成第 II 期又は第 III 期、最適には胞子形成期第 II 期に関与する遺伝子群が好ましい。斯かる遺伝子群は、目的タンパク質の生産には直接関与しておらず、また、通常の工業的生産培地における微生物の生育にも不要であることが本発明者らによって見出された。

枯草菌における当該遺伝子の一例を下記表 1 及び表 2 に示す。

尚、本明細書の各遺伝子の名称、位置、塩基番号及び機能は、Nature, 390, 249-256, (1997) で報告され、JAFAN: Japan Functional Analysis Network

for *Bacillus subtilis* (BSORF DB) でインターネット公開 (<http://bacillus.genome.ad.jp/>) された枯草菌ゲノムデータに基づいて記載している。

表 1

遺伝子	位置 (kb)	機能
sigE	1604	第Ⅱ期、母細胞特異的 σ E 因子
sigF	2443	第Ⅱ期、フォアスポア特異的 σ F 因子
spo II SB	1328	第Ⅱ期以降、胞子形成関与
spo II E	71	第Ⅱ期、フォアスポア特異的 σ F 因子活性化
sigG	1605	第Ⅲ-Ⅴ期、フォアスポア特異的 σ G 因子
spoIVCB- spo III C	2652-2701	第Ⅳ-Ⅴ期、母細胞特異的 σ K 因子

表 2

遺伝子	位置 (kb)	機能
spo II GA	1604	第Ⅱ期、母細胞特異的 σ E 因子活性化
spo II AA	2444	第Ⅱ期、フォアスポア特異的 σ F 因子活性化関与
spoIVFB	2855	第Ⅳ-Ⅴ期、母細胞特異的 σ K 因子活性化
spo II R	3794	第Ⅱ期、母細胞特異的 σ E 因子活性化関与
spo III J	4213	第Ⅲ-Ⅴ期、フォアスポア特異的 σ G 因子活性化関与

また、表 1 及び表 2 に示される枯草菌の各遺伝子と同じ機能を有するか又は表 1 の各遺伝子と 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上の相同性を有する、他の微生物由来、好ましくはバチルス属細菌の由来の遺伝子は、表 1 に記載の遺伝子に相当する遺伝子と考えられ、本発明において削除又は不活性化すべき遺伝子に含まれる。尚、アミノ酸配列の相同性は Lipman-Pearson 法 (Science, 227, 1435, (1985)) によって計算される。

斯かる遺伝子群の中から選ばれる 1 又は複数の遺伝子を削除又は不活性化することにより胞子形成に關与する化学エネルギーの消費が減ること、また、タンパク質又はポリペプチドの生産期間が長期化することに等により、当該タンパク質又はポリペプチドの生産において、その生産性の向上が達成される。

尚、削除又は不活性化する遺伝子は 1 以上であればよく、3 以上でも 5 以上でもよいが、2 又は 3 が好ましく、特に 2 が好ましい。

更に本発明の微生物の構築には、上記以外の遺伝子群の削除又は不活性化を組み合わせることも可能であり、生産性向上に対してより大きな効果が期待される。

遺伝子群の削除又は不活性化の方法は、公知の方法、例えば標的遺伝子を順次削除又は不活性化する方法や、ランダムな遺伝子の削除又は不活性化変異を与えた後、適当な方法によりタンパク質生産性の評価及び遺伝子解析を行うことによって遺伝子群の削除又は不活性化する方法等を用いることができる。

標的とする遺伝子を削除又は不活性化するには、例えば相同組換えによる方法を用いればよい。すなわち、標的遺伝子を含む DNA 断片を適当なプラスミドベクターにクローニングした後、通常の遺伝子工学技術を用いて遺伝子の全領域又は一部領域を両側の DNA 断片を残した形で削除する、塩基置換やフレームシフト等によって構造遺伝子中にナンセンス変異を与える、或いはクローニングや PCR などにより単離した目的遺伝子断片中に他の DNA 断片を挿入する等の改変を行った後、改変遺伝子を含む DNA 断片を、親微生物に取り込ませて、親微生物ゲノムとの間で目的遺伝子の外側の両領域で相同組換えを起こさせることにより、ゲノム上の標的遺伝子を削除或いは不活性化した遺伝子断片と置換することが可能である。

特に、本発明微生物を構築するための親微生物として枯草菌を用いる場合、相同組換えにより標的遺伝子を削除又は不活性化する方法については、既にいくつかの報告例があり (Mol. Gen. Genet., 223, 268 (1990) 等)、こうした方法を繰り返すことによって、本発明の宿主微生物を得ることができる。

また、ランダムな遺伝子の削除又は不活性化についてもランダムにクローニングしたDNA断片を用いて上述の方法と同様な相同組換えを起こさせる方法や、親微生物に γ 線等を照射すること等によっても実施可能である。

かくして得られた孢子形成中期から後期において孢子の形成に関与する遺伝子群から選ばれた1以上の遺伝子を削除又は不活性化した微生物（宿主微生物）に、目的とするタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入することによって、本発明の組換え微生物を得ることができる。

目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は特に限定されず、洗剤、食品、繊維、飼料、化学品、医療、診断など各種産業用酵素や、生理活性ペプチドなどが含まれる。また、産業用酵素の機能別には、酸化還元酵素 (Oxidoreductase)、転移酵素 (Transferase)、加水分解酵素 (Hydrolase)、脱離酵素 (Lyase)、異性化酵素 (Isomerase)、合成酵素 (Ligase/Synthetase) 等が含まれるが、好適にはセルラーゼ、 α -アミラーゼ、プロテアーゼ等の加水分解酵素の遺伝子が挙げられる。具体的には、多糖加水分解酵素の分類 (Biochem. J., 280, 309 (1991)) 中でファミリー5に属するセルラーゼが挙げられ、中でも微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセルラーゼが挙げられる。より具体的な例として、配列番号1又は2に示される配列を有するバチルス属細菌由来のアルカリセルラーゼや、配列番号1又は2に示される配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上の相同性を有する配列のセルラーゼが挙げられる。尚、アミノ酸配列の相同性はLipman-Pearson法 (Science, 227, 1435, (1985)) によって計算される。また、 α -アミラーゼの具体例としては、微生物由来の α -アミラーゼが挙げられ、特にバチルス属細菌由来の液化型アミラーゼが好ましい。また、プロテアーゼの具体例としては、微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼや金属プロテアーゼ等が挙げられる。

また、目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は、その上流に当該遺伝子の転写、翻訳及び分泌に関わる制御領域、即ち、プロモーター及び転写開始点を含む

転写開始制御領域、リボソーム結合部位及び開始コドンを含む翻訳開始領域、又は分泌用シグナルペプチド領域が適正な形で結合されていることが望ましい。例えば、特開2000-210081号公報や特開平4-190793号公報等に記載されているバチルス属細菌由来のセルラーゼ遺伝子、及び当該セルラーゼ遺伝子上流1 kb以内、好ましくは0.6 kb以内にある領域に由来する上記制御領域、より具体的には配列番号1又は2に示される配列又はこれらとある程度の相同性を有し同様の制御機能を有する塩基配列等が結合されていることが望ましい。

上記の目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子を含むDNA断片と適当なプラスミドベクターを結合した組換えプラスミドを、一般的な形質転換法によって宿主微生物細胞に取り込ませることによって、本発明の組換え微生物を得ることができる。また、当該DNA断片に宿主微生物ゲノムとの適当な相同領域を結合したDNA断片を用い、宿主微生物ゲノムに直接組み込むことによっても本発明の組換え微生物を得ることができる。

本発明の組換え微生物を用いた目的タンパク質又はポリペプチドの生産は、当該菌株を同化性の炭素源、窒素源、その他の必須成分を含む培地に接種し、通常の微生物培養法にて培養し、培養終了後、タンパク質又はポリペプチドを採取・精製することにより行えばよい。

以上より、目的とする孢子形成関与の遺伝子を削除又は不活性化した宿主微生物、及び当該宿主微生物を用いて組換え微生物を構築することができ、これを用いれば有用なタンパク質又はポリペプチドを効率的に生産することができる。以下に、枯草菌を用いて α -アミラーゼ又はセルラーゼを生産する場合について具体的に説明する。

例えば、枯草菌において孢子形成の第Ⅱ期以降にフォアスポア内で発現するRNAポリメラーゼのサブユニット σ^F 因子をコードするsigF遺伝子(768 bp)を削除する場合、以下の様に行えばよい。

まず、宿主とする枯草菌株から抽出したゲノム遺伝子を鋳型としてSOE (

splicing by overlap extention) - PCR法 (Gene, 77, 61, (1989)) 等により、s i g F 遺伝子の開始コドンより上流側のDNA断片と終止コドンより下流側のDNA断片が、その間にクロラムフェニコール耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を挿入した形で結合したDNA断片を調製する。

次に、得られたDNA断片によって宿主枯草菌株をコンピテント法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性等を指標として形質転換体を分離することによって、s i g F 遺伝子上流側と下流側で相同組換えが起こり、ゲノム上のs i g F 遺伝子がクロラムフェニコール耐性遺伝子等のマーカー遺伝子と置換した形質転換体を取得することができる。

続いて、得られた形質転換体及び対照として元の枯草菌株に、 α -アミラーゼ又はセルラーゼをコードする遺伝子が含まれるプラスミドを導入して、得られる組換え体を適当な条件、例えば栄養培地における振とう培養などを行った後、培養液上清液の α -アミラーゼ活性又はセルラーゼ活性を測定し元の宿主枯草菌株の生産性と比較することによって、s i g F 遺伝子の削除による目的生産物の高生産化を確認することができる。また、この培養液から採取・精製することによって、 α -アミラーゼ又はセルラーゼを得ることができる。

実施例

実施例 1

枯草菌 168 株から抽出したゲノムDNAを鋳型として増幅した、ゲノム上のs i g F 遺伝子 (塩基番号: 2442658←2443425) の上流に隣接する1.5 kb断片 (A)、及び下流に隣接する1.5 kb断片 (B) と、プラスミド pC194を鋳型として増幅したクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む0.9 kb断片 (C) を、(A) (B) (C) の順になる様にSOE-PCR法によって結合させ、3.9 kbのDNA断片を得た。このDNA断片を用いて、コンピテント法により枯草菌 168 株の形質転換を行い、クロラムフェニコールを含むLB寒天

培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した。この結果得られた形質転換体ではゲノム上の *sigF* 遺伝子を含む領域 (2442632-2443318) が削除され、クロラムフェニコール遺伝子に置換していることをPCR及びシーケンシングにより確認された。一方、上記と同様にして、ゲノム上の *sigE* 遺伝子 (1604166→1604885) を含む領域 (1604136-1604976)、*spoII SB* 遺伝子 (1347913←1348083) の大部分を含む領域 (1347781-1348081)、*spoII E* (70536→73019) 遺伝子の大部分を含む領域 (70537-73018)、*sigG* 遺伝子 (1605025→1605807) の大部分を含む領域 (1605083-1605877)、*spoIVCB* 遺伝子 (2652262→2652732) を含む領域 (2652156-2652723)、又は、*spoIVCB* 遺伝子から *spoIIIC* 遺伝子までの領域 (2652262→2701023) を含む領域 (2652156-2701031) が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換した孢子形成遺伝子削除株をそれぞれ得た。

実施例1にて得られた各遺伝子削除株と対照として枯草菌168株に、バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-S237株由来のアルカリセルラーゼ遺伝子 (特開2000-210081号公報) 断片 (3.1 kb) がシャトルベクター pH Y300PLKの *BamHI* 制限酵素切断点に挿入された組換えプラスミド pH Y-S237を、プロトプラスト法によって導入した。これによって得られた菌株を10mLのLB培地で一夜37℃で振盪培養を行い、更にこの培養液0.05mLを50mLの2×L-マルトース培地 (2%トリプトン、1%酵母エキス、1%NaCl、7.5%マルトース、7.5ppm硫酸マンガン4-5水和物、15ppmテトラサイクリン) に接種し、30℃で3日間、振盪培養を行った。培養後、遠心分離によって菌体を除いた培養液上清のアルカリセルラーゼ活性を測定し、培養によって菌体外に分泌生産されたアルカリセルラーゼの量を求めた。この結果、表3に示した様に、孢子形成遺伝子削除株を用いた場合はいずれも、対照の168株 (野生型) の場合と比較して高いアルカリセルラーゼの分泌生産が認められた。

表 3

削除遺伝子	遺伝子位置 (kb)	アルカリセルラーゼ分泌生産量 (相対値)
sigE	1604	217
sigF	2443	212
spo II SB	1328	140
spo II E	71	216
sigG	1605	163
spoIVCB- spoIIIC	2652-2701	141
spoIVCB	2652	141
なし (野生型)	—	100

産業上の利用可能性

本発明の微生物を用いれば、胞子が形成されないことから、目的タンパク質又はポリペプチドを生産する場合において、エネルギーロス、副産物の生産や比生産速度の低下等、培地の浪費が大幅に減少でき、また、タンパク質又はポリペプチドの生産期間が長期化することによって効率よく目的生産物を生産することができる。

請求の範囲

1. 孢子形成中期から後期において孢子の形成に関与する遺伝子群から選ばれた1以上の遺伝子を削除又は不活性化した微生物。
2. 微生物がバチルス属細菌である請求項1記載の微生物。
3. バチルス属細菌が枯草菌である請求項2記載の微生物。
4. 遺伝子群が、孢子形成第II期、第III期、第IV期、又は第V期に発現し、孢子形成に関与するものである請求項1～3のいずれか1項記載の微生物。
5. 削除又は不活性化される遺伝子が、枯草菌のsigE、sigF、spoIIIE、spoIIISB及びsigGのいずれか、spoIVCBからspoIIICまでの領域に含まれる遺伝子群、並びに当該遺伝子又は遺伝子群に相当する遺伝子のいずれか1以上から選ばれるものである請求項1～4のいずれか1項記載の微生物。
6. 請求項1～5のいずれか1項記載の微生物に転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌用シグナル領域の下流に結合したタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して得られる組換え微生物。
7. 転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域が、バチルス属細菌のセルラーゼ遺伝子又は該セルラーゼ遺伝子上流1 kb以内にある領域に由来するものである請求項6記載の組換え微生物。
8. 転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域が、配列番号1若しくは配列番号2又はこれらと70%以上の相同性を有するセルラーゼ遺伝子に由来するものである請求項6又は7記載の組換え微生物。
9. 請求項6～8のいずれか1項記載の微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Host microorganisms

<130> KS0660

<140>

<141>

<150> JP P2001-160520

<151> 2001-05-29

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3150

<212> DNA

<213> Bacillus sp. KSM-S237

<220>

<221> CDS

<222> (573)..(3044)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (573)..(659)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (660)..(3044)

<400> 1

gatttgccga tgcaacaggc ttataattag aggaaatttc tttttaaat gaatacggaa 60

taaaatcagg taaacaggtc ctgattttat tttttgagt ttttagaga actgaagatt 120

gaaataaaag tagaagacaa aggacataag aaaattgcat tagttttaat tatagaaaac 180

gccittttat aattatttat acctagaacg aaaatacigt ttcgaaagcg gtttactata 240

aaaccttata ttccggctct tttttaaaac agggggtaaa aattcactct agtattctaa 300

tttcaacaatg ctataaiaaa tttgtaagac gcaataatgca tctctttttt tacgatatat	360
gtaagcgggtt aaccttgtgc tataatgccga tttaggaagg ggggtagatt gagtcaagia	420
gtaataatat agataactta taagtgttig agaagcagga gagcaictgg gttactcaca	480
agttttttta aaactttaac gaaagcactt tccgtaatgc ttaatgaattt agctatttga	540
ttcaattact ttaaaaaatat ttaggaggta at atg atg tta aga aag aaa aca	593
Met Met Leu Arg Lys Lys Thr	
-25	
aag cag ttg att tct tcc att ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta	641
Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu	
-20 -15 -10	
ttt ccg gca gct ctt gca gca gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt	689
Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe	
-5 -1 1 5 10	
aaa cat tta tta ggt aat gac aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc	737
Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly	
15 20 25	
gca tta caa tta caa gaa gtc gat gga caa atg aca tta gta gat caa	785
Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln	
30 35 40	
cat gga gaa aaa att caa tta cgt gga atg agt aca cac gga tta cag	833
His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln	
45 50 55	
tgg ttt cct gag atc ttg aat gat aac gca tac aaa gct ctt tct aac	881
Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn	
60 65 70	
gat tgg gat tcc aat atg att cgt ctt gct atg tat gta ggt gaa aat	929
Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn	
75 80 85 90	
ggg tac gct aca aac cct gag tta atc aaa caa aga gtg att gat gga	977
Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly	
95 100 105	
att gag tta gcg att gaa aat gac atg tat gtt att gtt gac tgg cat	1025
Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His	

110	115	120	
gtt cat gcg cca ggt gat cct aga gat cct gtt tat gca ggt gct aaa			1073
Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys			
125	130	135	
gat ttc ttt aga gaa att gca gct tta tac cct aat aat cca cac att			1121
Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile			
140	145	150	
att tat gag tta gcg aat gag ccg agt agt aat aat aat ggt gga gca			1169
Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala			
155	160	165	170
ggg att ccg aat aac gaa gaa ggt tgg aaa gcg gta aaa gaa tat gct			1217
Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala			
175	180	185	
gat cca att gta gaa atg tta cgt aaa agc ggt aat gca gat gac aac			1265
Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn			
190	195	200	
att atc att gtt ggt agt cca aac tgg agt cag cgt ccg gac tta gca			1313
Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala			
205	210	215	
gct gat aat cca att gat gat cac cat aca atg tat act gtt cac ttc			1361
Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe			
220	225	230	
tac act ggt tca cat gct gct tca act gaa agc tat ccg tct gaa act			1409
Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr			
235	240	245	250
cct aac tct gaa aga gga aac gta atg agt aac act cgt tat gcg tta			1457
Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu			
255	260	265	
gaa aac gga gta gcg gta ttt gca aca gag tgg gga acg agt caa gct			1505
Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala			
270	275	280	
agt gga gac ggt ggt cct tac ttt gat gaa gca gat gta tgg att gaa			1553
Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu			
285	290	295	

ttt tta aat gaa aac aac att agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat	1601
Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn	
300 305 310	
aaa aat gaa gta tct ggt gca ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct	1649
Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser	
315 320 325 330	
aac gca acc aat ctt gac cca ggt cca gat cat gtg tgg gca cca gaa	1697
Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro Asp His Val Trp Ala Pro Glu	
335 340 345	
gaa tta agt ctt tct gga gaa tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg	1745
Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val	
350 355 360	
aac tat gag cca atc gac cgt aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac	1793
Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp	
365 370 375	
ttt aat gat gga acg aag caa gga ttt gga gtg aat tcg gat tct cca	1841
Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro	
380 385 390	
aat aaa gaa ctt att gca gtt gat aat gaa aac aac act ttg aaa gtt	1889
Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val	
395 400 405 410	
tcg gga tta gat gta agt aac gat gtt tca gat ggc aac ttc tgg gct	1937
Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala	
415 420 425	
aat gct cgt ctt tct gcc aac ggt tgg gga aaa agt gtt gat att tta	1985
Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu	
430 435 440	
ggt gct gag aag ctt aca atg gat gtt att gtt gat gaa cca acg acg	2033
Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr	
445 450 455	
gta gct att gcg gcg att cca caa agt agt aaa agt gga tgg gca aat	2081
Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn	
460 465 470	
cca gag cgt gct gtt cga gtg aac gcg gaa gat ttt gtc cag caa acg	2129
Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr	

475	480	485	490	
gac ggt aag tat aaa gct gga tta aca att aca gga gaa gat gct cct				2177
Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro				
	495	500	505	
aac cta aaa aat atc gct ttt cat gaa gaa gat aac aat atg aac aac				2225
Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn				
	510	515	520	
atc att ctg ttc gtg gga act gat gca gct gac gtt att tac tta gat				2273
Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp				
	525	530	535	
aac att aaa gta att gga aca gaa gtt gaa att cca gtt gtt cat gat				2321
Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val Glu Ile Pro Val Val His Asp				
	540	545	550	
cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct gtt ttt gaa gac ggt aca cgt				2369
Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg				
	555	560	565	570
caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct ggt gtg aaa aca gct tta aca				2417
Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr				
	575	580	585	
att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg tta tca tgg gaa ttt gga tat				2465
Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr				
	590	595	600	
cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg gca aca gct cca cgt tta gat				2513
Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp				
	605	610	615	
ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt gag aat gat tat gta gct ttt				2561
Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe				
	620	625	630	
gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca aca gaa ggc gca atg aat atc				2609
Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile				
	635	640	645	650
aat tta gta ttc cag cca cct act aac ggg tat tgg gta caa gca cca				2657
Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro				
	655	660	665	

aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa tta gag gaa gcg aat caa gta 2705
 Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val
 670 675 680

aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa att aac gta aga gat att aca 2753
 Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr
 685 690 695

aac att caa gat gac acg tta cta cgt aac atg atg atc att ttt gca 2801
 Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala
 700 705 710

gai gta gaa agt gac ttt gca ggg aga gtc ttt gta gat aat gtt cgt 2849
 Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg
 715 720 725 730

ttt gag ggg gct gct act act gag ccg gtt gaa cca gag cca gtt gat 2897
 Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp
 735 740 745

cct ggc gaa gag acg cca cct gtc gat gag aag gaa gcg aaa aaa gaa 2945
 Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu
 750 755 760

caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa gaa gca gta aaa gaa gaa aag 2993
 Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys
 765 770 775

aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca gtc aaa aat gag gct aag aaa 3041
 Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys
 780 785 790

aaa taatctatta aactagttat agggttatct aaaggctctga ttagatcttt 3094
 Lys
 795

tiagataacc ttttcttgc ataactggac acagagtgt tattaaagaa agtaag 3150

<210> 2

<211> 3332

<212> DNA

<213> Bacillus sp. KSM-64

<220>

<221> CDS

<222> (610).. (3075)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (610).. (696)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (697).. (3075)

<400> 2

```

agtacttacc attttagagt caaaagatag aagccaagca ggattlgccg atgcaaccgg 60
cttatattta gaggggaattt ctttttaaat tgaatcagga ataaaatcag gtaaacaggt 120
ccigatttta tttttttgaa tttttttgag aactaaagat tgaaatagaa gtagaagaca 180
acggacataa gaaaattgia ttagttttta ttatagaaaa cgcttttcta taattattta 240
tacctagaac gaaaatactg tticgaaagc ggtttactat aaaacctat attccggctc 300
tttttttaaa caggggggtga aaattcactc tagtatctta atttcaacat gctataataa 360
atttgtaaga cgcaatatac atcttttttt taigatatit gtaagcgggt aacctgtgic 420
tatatgccga tttaggaagg gggtagattg agtcaagtag tcataattta gataacctat 480
aagttgttga gaagcaggag agaatctggg ttactcacia gttttttaaa acattatcga 540
aagcacttgc ggttatgcit atgaatttag ctatttgatt caattacttt aataatttta 600
ggaggtaat atg atg tta aga aag aaa aca aag cag ttg att tct tcc att 651
      Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile
                -25                      -20

```

```

ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta ttt ccg aca gct ctt gca gca 699
Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ala
-15                -10                -5                -1    1

```

```

gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt aaa cat tta tta ggt aat gac 747
Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp
                5                10                15

```

```

aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc gca tta caa tta caa gaa gtc 795
Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val
                20                25                30

```

gat gga caa atg aca tta gta gat caa cat gga gaa aaa att caa tta	843
Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu	
35 40 45	
cgt gga atg agt aca cac gga tta caa tgg ttt cct gag atc ttg aat	891
Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn	
50 55 60 65	
gat aac gca tac aaa gct ctt gct aac gat tgg gaa tca aat atg att	939
Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met Ile	
70 75 80	
cgt cta gct atg tat gtc ggt gaa aat ggc tat gct tca aat cca gag	987
Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro Glu	
85 90 95	
tta att aaa agc aga gtc att aaa gga ata gat ctt gct att gaa aat	1035
Leu Ile Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu Asn	
100 105 110	
gac atg tat gtc atc gtt gat tgg cat gta cat gca cct ggt gat cct	1083
Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro	
115 120 125	
aga gat ccc gtt tac gct gga gca gaa gat ttc ttt aga gat att gca	1131
Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile Ala	
130 135 140 145	
gca tta tat cct aac aat cca cac att att tat gag tta gcg aat gag	1179
Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu	
150 155 160	
cca agt agt aac aat aat ggt gga gct ggg att cca aat aat gaa gaa	1227
Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu	
165 170 175	
ggt tgg aat gcg gta aaa gaa tac gct gat cca att gla gaa atg tta	1275
Gly Trp Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu	
180 185 190	
cgt gat agc ggg aac gca gat gac aat att atc att gtg ggt agt cca	1323
Arg Asp Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro	
195 200 205	
aac tgg agt cag cgt cct gac tta gca gct gat aat cca att gat gat	1371

aat gaa gcg ggc gct tta aaa ctt tca gga tta gat gca agt aat gat	1947
Asn Glu Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn Asp	
405 410 415	
ggt tct gaa ggt aat tac tgg gct aat gct cgt ctt tct gcc gac ggt	1995
Val Ser Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp Gly	
420 425 430	
tgg gga aaa agt gtt gat att tta ggt gct gaa aaa ctt act atg gat	2043
Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp	
435 440 445	
gtg att gtt gat gag ccg acc acg gta tca att gct gca att cca caa	2091
Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro Gln	
450 455 460 465	
ggg cca tca gcc aat tgg gtt aat cca aat cgt gca att aag gtt gag	2139
Gly Pro Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val Glu	
470 475 480	
cca act aat ttc gta ccg tta gga gat aag ttt aaa gcg gaa tta act	2187
Pro Thr Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu Thr	
485 490 495	
ata act tca gct gac tct cca tcg tta gaa gct att gcg atg cat gct	2235
Ile Thr Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His Ala	
500 505 510	
gaa aat aac aac atc aac aac atc att ctt ttt gta gga act gaa ggt	2283
Glu Asn Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu Gly	
515 520 525	
gct gat gtt atc tat tta gat aac att aaa gta att gga aca gaa gtt	2331
Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val	
530 535 540 545	
gaa att cca gtt gtt cat gat cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct	2379
Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser	
550 555 560	
gtt ttt gaa gac ggt aca cgt caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct	2427
Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser	
565 570 575	
ggt gtg aaa aca gct tta aca att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg	2475

Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala	
580	585 590
tta tca tgg gaa ttt gga tac cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg	2523
Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp	
595	600 605
gca aca gct cca cgt tta gat ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt	2571
Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly	
610	615 620 625
gaa aat gat tat gta act ttt gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca	2619
Glu Asn Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala	
630	635 640
aca gaa ggc gca atg aat atc aat tta gta ttc cag cca cct act aac	2667
Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn	
645	650 655
ggg tat tgg gta caa gca cca aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa	2715
Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu	
660	665 670
tta gag gaa gcg aat caa gta aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa	2763
Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys	
675	680 685
att aac gta aga gat att aca aac att caa gat gac acg tta cta cgt	2811
Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg	
690	695 700 705
aac atg atg atc att ttt gca gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga	2859
Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg	
710	715 720
gtc ttt gta gat aat gtt cgt ttt gag ggg gct gct act act gag ccg	2907
Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro	
725	730 735
gtt gaa cca gag cca gtt gat cct ggc gaa gag acg ccg cct gtc gat	2955
Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp	
740	745 750
gag aag gaa gcg aaa aaa gaa caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa	3003
Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys	
755	760 765

gaa gca gta aaa gaa gaa aag aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca 3051
Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala
770 775 780 785

atc aaa aat gag gct acg aaa aaa taatciaata aactagttat agggttatct 3105
Ile Lys Asn Glu Ala Thr Lys Lys
790

aaaggctcga tgcagatcct ttagataacc tttttctgca taactggaca tagaatggct 3165

attaaagaaa gcaaggctgt tttacgatat taaaaaggta gcgattttta attgaaacct 3225

ttaataatgt ctgtgatag aatgatgaag taatttaaga gggggaaacg aagtgaaaac 3285

ggaaatttct agtagaagaa aaacagacca agaaatactg caagctt 3332

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/21, C12N15/09, C12N9/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/21, C12N15/09, C12N9/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG),
SwissProt/PIR/GeneSeq/GenBank/EMBL/DBJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	EP 492274 A2 (Eniricerche Societa per Azioni), 13 October, 1992 (13.10.92), & US 6284490 B1 & JP 4-287686 A	<u>1-4</u> 5-9
<u>X</u> Y	KENNEY T.J., Moran C.P. Jr., Organization and regulation of an operon that encodes a sporulation- essential sigma factor in Bacillus subtilis., J.Bacteriol. 1987, Jul.;169(7):3329-39	<u>1-5</u> 6-9
<u>X</u> Y	MIN K.T., Yudkin M.D., Activity of mutant sigma F proteins truncated near the C terminus., J.Bacteriol. 1992 Nov.;174(22):7144-8	<u>1-5</u> 6-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
26 July, 2002 (26.07.02)

Date of mailing of the international search report
13 August, 2002 (13.08.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05151

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	BARAK I., Youngman P., SpoIIE mutants of Bacillus subtilis comprise two distinct phenotypic classes consistent with a dual functional role for the SpoIIE protein., J.Bacteriol. 1996 Aug.;178(16): 4984-9	<u>1-5</u> 6-9
<u>X</u> Y	TAKAMATSU H. et al., The Bacillus subtilis yabG gene is transcribed by SigK RNA polymerase during sporulation, and yabG mutant spores have altered coat protein composition., J.Bacteriol. 2000 Apr.; 182(7):1883-8	<u>1-5</u> 6-9
Y	JP 2000-210081 A (Kao Corp.), 02 August, 2000 (02.08.00), Par. Nos. [0010], [0014]; sequence No.1 (Family: none)	6-9
P,X	KIM J.H. et al., Construction of spore mutants of Bacillus subtilis for the development as a host for foreign protein production., Biotechnology Letters, June 2001, Vol.23, No.12, pages 999 to 1004	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl. ⁷ C12N1/21, C12N15/09, C12N9/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N1/21, C12N15/09, C12N9/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG),
SwissProt/PIR/GeneSeq/Genbank/EMBL/DDBJ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	EP 492274 A2 (Eniricerche Societa per Azioni) 1992.10.13 & US 6284490 B1 & JP 4-287686 A	<u>1-4</u> 5-9
<u>X</u> Y	KENNEY TJ, Moran CP Jr., Organization and regulation of an operon that encodes a sporulation-essential sigma factor in Bacillus subtilis., J Bacteriol. 1987 Jul;169(7):3329-39.	<u>1-5</u> 6-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.07.02

国際調査報告の発送日

13.08.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子



4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	MIN KT, Yudkin MD., Activity of mutant sigma F proteins truncated near the C terminus., J Bacteriol. 1992 Nov; 174(22):7144-8.	<u>1-5</u> 6-9
<u>X</u> Y	BARAK I, Youngman P., SpoIIE mutants of Bacillus subtilis comprise two distinct phenotypic classes consistent with a dual functional role for the SpoIIE protein., J Bacteriol. 1996 Aug;178(16):4984-9.	<u>1-5</u> 6-9
<u>X</u> Y	TAKAMATSU H, et al., The Bacillus subtilis yabG gene is transcribed by SigK RNA polymerase during sporulation, and yabG mutant spores have altered coat protein composition., J Bacteriol. 2000 Apr;182(7):1883-8.	<u>1-5</u> 6-9
Y	JP 2000-210081 A (花王株式会社) 2000.08.02 (ファミリーなし) 段落【0010】、【0014】及び配列番号1参照	6-9
P, X	KIM J.H. et al., Construction of spore mutants of Bacillus subtilis for the development as a host for foreign protein production., Biotechnology Letters, June 2001, Vol.23, No.12, pages 999-1004	1-9